

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP 03/01006

31.01.03

#2

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 2月 1日

REC'D 28 MAR 2003

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-025622

[ST.10/C]:

[JP2002-025622]

出 願 人

Applicant(s):

日清紡績株式会社

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN

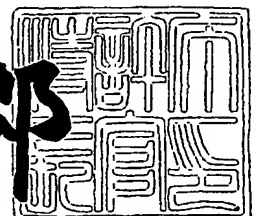
COMPLIANCE WITH

RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 3月11日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



BEST AVAILABLE COPY 出証番号 出証特2003-3014889

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-9588

【提出日】 平成14年 2月 1日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 生体分子の担体への固定法

【請求項の数】 6

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台 1 - 2 - 3 日清紡績株式会社
研究開発センター内

【氏名】 小田 竜一

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台 1 - 2 - 3 日清紡績株式会社
研究開発センター内

【氏名】 木村 直紀

【特許出願人】

【識別番号】 000004374

【氏名又は名称】 日清紡績株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 生体分子の担体への固定法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 生体分子を担体に固定化する方法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長 280 nm の成分を含む紫外線を照射する工程を含み、前記担体は合成樹脂製であることを特徴とする方法。

【請求項 2】 前記合成樹脂は、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、アクリロニトリルブタジエンスチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリジメチルシロキサン、ポリブタジエン、ポリオキシメチレン、ポリイソプレン、ポリイソブチレン、ポリオキシエチレン、ポリフッ化ビニリデン、ポリ塩化ビニリデン、ポリアクリル酸メチル、ポリ酢酸ビニル、ナイロン 6、ナイロン 66、ポリメタクリル酸エチル、ポリ塩化ビニル、ポリビニルアルコール、ポリアクリロニトリル、セルローストリアセテート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエーテルスルホン、ポリ-*m*-フェニレンイソフタラミド、ポリピロメリッドイミド、ポリ-*p*-フェニレンテレフタラミド、エポキシ樹脂、ABS、テフロンから選ばれる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記紫外線の照射量は $100 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ 以上である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】 前記生体分子は核酸、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド、酵素から選ばれる請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】 生体分子が担体上に固定化された生体分子固定化担体の製造法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長 280 nm の成分を含む紫外線を照射し、前記生体分子を担体に固定化する工程を含む方法。

【請求項 6】 前記生体分子は核酸であって、核酸固定化担体はハイブリダイゼーションによる核酸の分析に用いられるものである請求項 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、核酸等の生体分子を担体に固定化する方法に関する。本発明の方法は、ハイブリダイゼーションによる核酸の分析等の操作に有用である。

【0002】

【従来技術】

従来、ハイブリダイゼーションによる核酸の分析や、イムノアッセイ等においては、核酸やタンパク質を膜や平板などの担体に固定化する技術が利用されている。このような生体分子の固定化法として、核酸では、以下のものが知られている。

【0003】

(1) 5' 末端にチオール基を有する核酸とチオール基を含むビーズ状基材間のジスルフィド結合による固定 (P.J.R.Day, P.S.Flora, J.E.Fox, M.R.Walker, *Biochem.J.*, 278, 735-740(1991)) 等のような、修飾基を導入した核酸を化学結合させる方法。

【0004】

(2) 核酸を、紫外線 (UV) 照射又は加熱処理により、ニトロセルロース、ナイロンメンブレン、又はポリ-L-リジン等のカチオンポリマーで被覆されたガラス等の担体等に、吸着固定させる方法 (J.Sambrook, E.F.Fritsch and T.Maniatis, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, Second Edition, pages 2.109-2.113 and pages 9.34-9.46、特表平10-503841号)。

【0005】

(3) ポリリジン溶液で処理されたマイクロプレートのウェル中に核酸を注入し、37℃に加熱することにより、物理吸着させることにより固定する方法 (G.C.N. Parry and A.D.B.Malcom, *Biochem. Soc.Trans.*, 17, 230-231(1989))。

【0006】

(4) 基材上に結合させたヌクレオチドを用い、基材上でDNAを合成する方法 (W097/10365)。

【0007】

(5) カルボジイミド基を有する高分子化合物を担持させたガラス等の基材に核酸を固定する方法(特開平8-23975)。

【0008】

しかし、上記の(1)の方法は、極めて特殊な機械と試薬を必要とする。また、(2)及び(3)の方法においては、ハイブリダイゼーションを行った場合、特に操作過程で担体から核酸が剥がれ落ち、結果として検出感度が下がったり、再現性が得られない等の欠点がある。また、この方法では、長い核酸は固定できるが、オリゴマー等約50mer以下の短い核酸になると、効率よく固定化できないという欠点がある。尚、これらの方法では、UV照射量は数十mJ/cm²程度である。さらに、(4)の方法は、基材上でDNAを合成するために、極めて特殊な機械と試薬を必要とし、さらに、合成できる核酸も25mer程度までに限られるという欠点がある。また、(5)の方法は、基材の材料が限られ、表面のコーティング工程が必要である。

【0009】

ところで、ポリスチレンフィルムに真空紫外線を照射して、表面を親水化する技術が報告されている(穂積ら、「表面技術」vol.52, No.12, p.97-98, 2001)。しかし、波長280nm程度の紫外線の照射によって、核酸を合成樹脂担体に固定化することができることは、開示されていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記従来技術の状況に鑑み、生体分子、例えば核酸、特に短鎖長の核酸を担体に、簡便、かつ、効率よく固定する方法を提供することを課題とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、核酸溶液を合成樹脂製の担体上にスポットした後に、紫外線を担体に照射することによって、核酸を担体に効率よく固定化することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

【 0 0 1 2 】

(1) 生体分子を担体に固定化する方法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長 2 8 0 n m の成分を含む紫外線を照射する工程を含み、前記担体は合成樹脂製であることを特徴とする方法。

(2) 前記合成樹脂は、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、アクリロニトリルブタジエンスチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリジメチルシロキサン、ポリブタジエン、ポリオキシメチレン、ポリイソプレン、ポリイソブチレン、ポリオキシエチレン、ポリフッ化ビニリデン、ポリ塩化ビニリデン、ポリアクリル酸メチル、ポリ酢酸ビニル、ナイロン 6、ナイロン 6 6、ポリメタクリル酸エチル、ポリ塩化ビニル、ポリビニルアルコール、ポリアクリロニトリル、セルローストリアセテート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエーテルスルホン、ポリ-*m*-フェニレンイソフタラミド、ポリピロメリッドイミド、ポリ-*p*-フェニレンテレフタラミド、エポキシ樹脂、A B S、テフロンから選ばれる(1)に記載の方法。

(3) 前記紫外線の照射量は $1 0 0 \text{ m J} / \text{c m}^2$ 以上である(1)又は(2)に記載の方法。

(4) 前記生体分子は核酸、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド、酵素から選ばれる(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 生体分子が担体上に固定化された生体分子固定化担体の製造法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長 2 8 0 n m の成分を含む紫外線を照射し、前記生体分子を担体に固定化する工程を含む方法。

(6) 前記生体分子は核酸であって、核酸固定化担体はハイブリダイゼーションによる核酸の分析に用いられるものである(5)に記載の方法。

【 0 0 1 3 】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に用いる担体は、生体分子を固定化するためのものであり、合成樹脂製であることを特徴とする。合成樹脂としては、紫外線照射により生体分子を固定化することができるものであれば特に制限されず、具体的には、ポリ(メチルメタクリレート)；ポリスチレン：ポリエチレン、ポリプロピレン等のポリオレフィン、アクリロニトリルブタジエンスチレン；ポリエチレンテレフタレート等のポリエステル；ポリカーボネート、ポリジメチルシロキサン、ポリブタジエン、ポリオキシメチレン、ポリイソブレン、ポリイソブチレン、ポリオキシエチレン、ポリフッ化ビニリデン、ポリ塩化ビニリデン、ポリアクリル酸メチル、ポリ酢酸ビニル、ナイロン 6、ナイロン 6 6、ポリメタクリル酸エチル、ポリ塩化ビニル、ポリビニルアルコール、ポリアクリロニトリル、セルローストリアセテート、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエーテルスルホン、ポリ-*m*-フェニレンイソフタラミド、ポリピロメリッドイミド、ポリ-*p*-フェニレンテレフタラミド、エポキシ樹脂、ABS、テフロン等が挙げられる。

また、上記合成樹脂に、染料、発色剤、可塑剤、顔料、重合禁止剤、表面改質剤、安定剤、密着性付与剤、熱硬化剤等を必要に応じて添加した合成樹脂を用いることができる。さらに、前記合成樹脂は、形状を保持するために異なる種類の前記合成樹脂が積層しても良く、単一合成樹脂であっても良い。また、前記合成樹脂を 2 種類以上混合した合成樹脂であっても良い。

上記担体の形状は、特に問われないが、平板状、フィルター状、ビーズ状等が挙げられる。また、マイクロタイタープレートのような形状であってもよい。

【0014】

上記担体の所定の位置に、生体分子の溶液をスポットする。生体分子としては、核酸、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド、酵素などが挙げられる。以下、生体分子として核酸を例として説明するが、固定の際に紫外線を照射する以外は、他の物質でも通常固定化に用いられている方法や条件を採用することができる。

核酸としては、通常の固相化核酸を用いた核酸同士のハイブリダイゼーションに用いられる固相化核酸と特に変わるところはなく、ハイブリダイゼーションが可能な核酸であれば特に制限されず、例えば、天然又は合成の DNA (オリゴヌ

クレオチドを含む) もしくはRNA (オリゴヌクレオチドを含む) が挙げられる。また、上記核酸は1本鎖であっても、2本鎖であっても構わない。核酸の鎖長は、ハイブリダイゼーションが可能な長さであれば特に制限されないが、通常5～50000塩基、好ましくは20～10000塩基である。また、核酸の5'末端あるいは3'末端にチミン等、紫外線によって反応活性基を有する重合体を有しても良い。

【0015】

核酸を溶解する溶媒も特に制限されず、蒸留水、又は通常核酸溶液の調製に用いられる緩衝液、例えばTE緩衝液(10mM Tris塩酸, pH8.0/1mM EDTA)等のTris緩衝液、食塩を含む水溶液、カルボン酸塩を含む水溶液(クエン酸ナトリウム、クエン酸アンモニウム、酢酸ナトリウム等)、スルホン酸塩を含む水溶液(ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸アンモニウム等)、ホスホン酸塩を含む水溶液等(リン酸ナトリウム、リン酸アンモニウム等)等を挙げることができる。また、一般に市販されている溶媒、Micro Spotting Solution(TeleChem International, Inc.社製)等も挙げることができる。また、核酸溶液の濃度も特に制限されないが、通常1mmol/ml～1fmol/ml、好ましくは100pmol/ml～100fmol/mlの濃度である。

【0016】

核酸溶液を担体上にスポットする方法としては、ピペットで核酸溶液を担体上に滴下する方法、又は市販のスポッタを用いる方法等が挙げられる。スポットの形状及びスポット量としては、核酸溶液をスポットした位置を把握することができる程度であれば、特に制限されないが、形状としては点状又は円状が好ましい。また、好ましいスポット量は10nl～10mlである。核酸溶液は、担体上に1箇所又は複数箇所にスポットされる。スポットされる核酸溶液は、1種類でも2種類又はそれ以上であってもよい。尚、担体に核酸が固定されたことを示す陽性コントロールとして、標識した核酸を固定化しておいてもよい。

【0017】

本発明の好ましい形態においては、核酸溶液を担体上にスポットした後に、280nmの波長を含む紫外線を照射することである。また、前記核酸溶液をスポッ

ト後紫外線照射前に乾燥させることができる。前記核酸溶液の乾燥方法としては、自然に乾燥させてもよく、加熱して乾燥させてもよい。加熱する場合の温度は、通常30～100℃、好ましくは35～45℃である。

【0018】

次に、担体、少なくとも担体の核酸を固定した部位に、波長280nmの成分を含む紫外線を照射する。具体的には、波長280nmを含むブロードな波形を有する紫外線であっても良い。照射量は、累積照射量として通常100mJ/cm²以上、好ましくは200mJ/cm²以上である。

【0019】

上記のようにして、核酸を担体上に固定化することにより、核酸固定化担体が製造される。本発明の方法により得られる核酸固定化担体は、例えば、ハイブリダイゼーションによる核酸の分析に用いることができる。本発明の方法により担体に固定化された核酸は、通常のハイブリダイゼーションの条件下で担体から脱離しにくいいため、紫外線照射を行わない場合に比べて検出感度が良好で、再現性も良い。ハイブリダイゼーション及びその検出は、通常の固相化核酸を用いたハイブリダイゼーションと同様にして行うことができる。

【0020】

本発明では、核酸を固定化するのに用いる担体として、安価な合成樹脂を用いているため、低コスト化が可能である。また、合成樹脂は軽量で形成が容易なため、様々な形態のDNAマイクロアレイの作製が容易となる。また、長期保存が可能であり、保存安定性に優れている。さらに、本発明の方法は、担体表面のコーティング工程が不要であり、操作が簡便である。

【0021】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

【0022】

【実施例1】核酸の平板への固定化

常法に従い、オリゴヌクレオチド合成機(Perkin-elmer Applied biosystems)を用いて、配列番号1、2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド(21mer

)を合成した。尚、配列番号1に示すオリゴヌクレオチドは、5'末端をビオチン化した。また、配列番号2に示すはビオチン化プローブと相補性を持っているこれらのオリゴヌクレオチドを $1\text{pmol}/\mu\text{l}$ になるように $1\times\text{TE}$ 緩衝液(10mM Tris 塩酸, pH 8/1mM EDTA)に溶解した。

【0023】

市販品のポリ(メチルメタクリレート)製の平板の所定の位置に、上記オリゴヌクレオチド溶液それぞれを、3箇所ずつスポットした(図1)。スポットの量は $0.5\mu\text{l}$ ずつであり、スポットの大きさは直径約1mmであった。この平板を乾燥機に入れ、 42°C で20分乾燥した。次にUvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製)を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から $200\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射した。照射時間は80秒であった。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

【0024】

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液($1\times\text{TE}$ 緩衝液)も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

【0025】

【比較例1】

予め、ポリ(メチルメタクリレート)製の平板に、Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製)を用い、波長280nmを含むnmの紫外線を16cmの距離から $200\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射した。実施例1に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、ポリ(メチルメタクリレート)製の平板の所定の位置に、3箇所ずつスポットした(図1)。スポットの量は $0.5\mu\text{l}$ ずつであり、スポットの大きさは直径約1mmであった。照射時間は80秒であった。この平板を乾燥機に入れ 42°C で20分乾燥した。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

【0026】

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液($1\times\text{TE}$ 緩衝液)も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

【0027】

【実施例2】ハイブリダイゼーション及びその検出

(1) ハイブリダイゼーション

実施例1及び比較例1のオリゴヌクレオチド固定化平板の核酸を固定化した部分に、3pmolピオチン化DNA (262bp) を含むハイブリダイゼーション溶液 (Array it UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60 μ l) をのせ、平板を水が浸入しないケース (ハイブリカセット) に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、45℃で2時間加熱した。配列番号2のオリゴヌクレオチドは、ピオチン化プローブと相補的な配列を含んでいる。

【0028】

(2) ポストハイブリダイゼーション

上記ハイブリダイゼーションの後、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行い、オリゴヌクレオチド固定化平板に非特異的に吸着したプローブを除去した。

【0029】

[ポストハイブリダイゼーション洗浄の条件]

- 1) 2×SSC, 0.1%SDS; 室温、5分間、2回
- 2) 0.2×SSC, 0.1%SDS; 40℃、5分間、2回
- 3) 2×SSC; 室温1分間、3回

【0030】

(3) 平板に固定化されたオリゴヌクレオチド及びハイブリダイゼーションの検出

平板のハイブリダイゼーション溶液を乗せた部分に、乳タンパクを含むブロッキング溶液 (ブロックエース 雪印乳業製) 1.5ml をのせ、室温で30分間ブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除いた後、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼコンジュゲート溶液 (VECTOR社製) を1.5ml のせ、室温で30分間反応させた。つぎに、平板をTBST (50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20) 溶液に浸し、5分間振とうして反応しなかったコンジュゲートを除去した。最後に、平板のハイブリダイゼーション溶液を乗せた部分に基質溶液 (TMB) を1.5ml のせて、30分間放置し、発色反応を行った。

【0031】

その結果を、次に示す比較例 1 の結果とともに、表 1 に示す。配列番号 1 のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルは固定化されたオリゴヌクレオチドの量を、配列番号 2 のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルはハイブリダイゼーションの強度を、それぞれ示す。

【0032】

【表 1】

表 1

固定化したオリゴヌクレオチド		
	配列番号 1	配列番号 2
実施例 1	◎	◎
比較例 1	×	×

◎：大部分のシグナルが非常に高感度かつ非常に明瞭に現れた。

○：大部分のシグナルが高感度かつ明瞭に現れた。

△：一部のシグナルが低感度または不明瞭に現れた。

×

大部分のシグナルが低感度または不明瞭に現れた。またはシグナルが全く現れなかった。

【0033】

表 1 の結果から明らかなように、実施例 1 のオリゴヌクレオチド固定化平板は、比較例 1 のオリゴヌクレオチド固定化平板に比べて、オリゴヌクレオチドが確実に平板上に固定化されていることがわかる。また、実施例 1 のオリゴヌクレオチド固定化平板では、ハイブリダイゼーションシグナルも明瞭に現れた。なお、コントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）にはシグナルはまったく現れなかった。

【0034】

【発明の効果】

本発明の方法により、生体分子、例えば核酸、特に鎖長の短い核酸を、合成樹脂製担体に簡便、かつ、効率よく固定することができる。

【 0 0 3 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Nisshinbo Industries, Inc.

<120> 生体分子の担体への固定法

<130> P-9588

<140>

<141> 2002-02-01

<160> 3

<170> PatentIn version 3.0

【 0 0 3 6 】

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> Description of Artificial Sequence: capture

oligonucleotide

<400> 1

aaatgggtac tgtgcctgtt a

21

[0 0 3 7]

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> Description of Artificial Sequence: capture
oligonucleotide

<400> 2

atgactaccg gcgcgacgat g

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> ()..()

<223> Description of Artificial Sequence: probe DNA

<400> 3

```

tcgcccgtg tttttgatga ggcggathtt ccggcagttg ccgtttatct caccggcgct 60
gaatacacgg gcgaagagct ggacagcgat acctggcagg cggagctgca tatcgaagtt 120
ttcctgcctg ctccaggtgcc ggattcagag ctggatgcgt ggatggagtc ccggatttat 180
ccggtgatga gcgatatccc ggcactgtca gatttgatca ccagtatggt ggccagcggc 240
tatgactacc ggcgcgacga tg                                     262

```

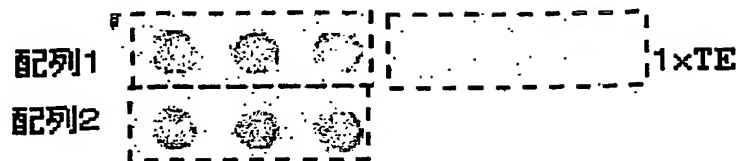
【図面の簡単な説明】

【図 1】 実施例で作製したオリゴヌクレオチド固定化平板を用いたハイブリダイゼーションの結果を示す図。

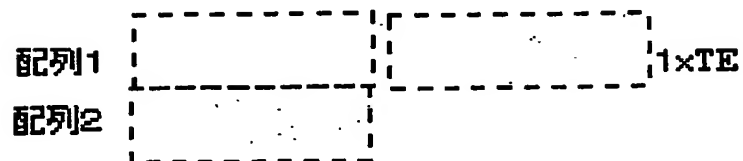
点線は、実施例 1 及び比較例 1 でオリゴヌクレオチドを固定化した領域、及びコントロールである 1×TE 緩衝液をスポットした領域を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



実施例1



比較例1

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生体分子、例えば核酸、特に短鎖長の核酸を担体に、簡便、かつ、効率よく固定する方法を提供する。

【解決手段】 核酸の溶液を、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、アクリロニトリルブタジエンスチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート等の合成樹脂からなる担体上にスポットし、同溶液を乾燥させ、担体に波長 280 nm の成分を含む紫外線を好ましくは $100 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ 以上照射することにより、前記担体に核酸を固定する。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000004374].

1. 変更年月日	1993年 3月30日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区日本橋人形町2丁目31番11号
氏 名	日清紡績株式会社